

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

*Applicants' copy*

DERWENT-ACC-NO: 1994-230220

DERWENT-WEEK: 199428

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Growing microorganisms which attack nematodes - by  
culture in medium contg. extract of nematode

PATENT-ASSIGNEE: NOYAKU BIOTECHNOLOGY KAIHATSU[NOYAN]

PRIORITY-DATA: 1992JP-0343550 (December 1, 1992)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES
MAIN-IPC			
JP 06165670 A	June 14, 1994	N/A	003 C12N 001/20

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 06165670A	N/A	1992JP-0343550	December 1, 1992

INT-CL (IPC): A01N063/00, C12N001/20 , C12N001/20 , C12R001:01

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 06165670A

BASIC-ABSTRACT:

Micro-organisms which attack nematodes are grown by using culture medium comprising an extract of nematodes (A) added to a culture medium for growing of

microorganisms (B). Pref.microorganisms are bacteria belonging to Pasteuria genus; and the nutrients and/or chemical ingredients contained in the extract of nematodes can be used in place of (A). (A) is obtd. from Meloidogyne incognita, Heterodera, Pratylenchus, Turbatrix, Caenorhabditis elegans, etc,

In an example, 30g of soybean peptone, 30g of yeast extract, 10g of glucose and

4.3g of MES in 950ml of distilled water. The soln. was pH 5.2. 1.0g of haemoglobin (from pork) in 20ml of distilled water was added. The culture

medium was used to grow 80000 nematodes (*Caenorhabditis elegans*) After 16 days, the nematodes were collected at 3500 rpm. 13g of nematodes was obtained. The frozen nematodes were thawed and subjected to cell lump breaker (spallator) for minute. The spallator liquid was homogenised by 1500 rpm, centrifuged at 16000 rpm and 16.8ml of nematodes crushed liquid obtd. 75ml of SP-4 culture medium and 25ml of nematodes crushed liquid were mixed and the pH adjusted to pH 6.2. *Pasteuria penetrans* extracted from female nematodes, *Meloidogyne incognita* was added to the medium and was kept in CO2 incubator at 28 deg. C. After 8 days from incubation, *Pasteuria penetrans* was collected by centrifuge.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: GROW MICROORGANISM ATTACK NEMATODE CULTURE  
MEDIUM CONTAIN EXTRACT  
NEMATODE

DERWENT-CLASS: C05 D16

CPI-CODES: C04-F10; C14-B03A; D05-H08;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M423 M720 M903 N131 P345 Q233 V500 V540

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1994-104685

PAT-NO: JP406165670A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 06165670 A

TITLE: METHOD FOR MULTIPLYING NATURAL ENEMY  
MICROORGANISM OF  
NEMATODE

PUBN-DATE: June 14, 1994

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

MORIYAMA, RYOICHI

TAKANO, KEIKO

MIKI, TETSUZO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

NOYAKU BIO TECHNOL KAIHATSU GIJUTSU

N/A

KENKYU KUMIAI

APPL-NO: JP04343550

APPL-DATE: December 1, 1992

INT-CL (IPC): C12N001/20, A01N063/00

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide the improved medium used for the multiplication of microorganisms and suitable for artificially culturing the natural enemy microorganisms of nematodes by adding the extract of the nematodes.

CONSTITUTION: The extract of a nematode and/or nutritive ingredients contained in the extract of the nematode or chemical ingredients are added to a medium for the multiplication of the microorganisms to produce the medium

suitable for the multiplication of the enemy microorganisms of the nematode.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-165670

(43)公開日 平成6年(1994)6月14日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
	E	7236-4B		
A 0 1 N 63/00	F	9159-4H		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:01)				
審査請求 未請求 請求項の数3(全 3 頁)				

(21)出願番号	特願平4-343550	(71)出願人	000233848 農業バイオテクノロジー開発技術研究組合 東京都中央区日本橋室町1-5-8 日本 橋倶楽部会館6階
(22)出願日	平成4年(1992)12月1日	(72)発明者	森山 亮一 茨城県つくば市大字要84-67
		(72)発明者	高野 慶子 茨城県筑波郡伊奈町谷井田1081
		(72)発明者	三木 鉄蔵 千葉県我孫子市布佐平和台5-10-19

(54)【発明の名称】 線虫の天敵微生物の増殖方法

(57)【要約】

【目的】線虫の抽出物を添加し、微生物増殖用の培地を改良することによって、線虫の天敵微生物を人工培養するために好適な増殖用の培地を提供する。

【構成】線虫の抽出物および／または線虫の抽出物に含まれる栄養分または化学成分を微生物増殖用の培地に加えて、線虫の天敵微生物の増殖に好適な培地を作成した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A)線虫の抽出物を(B)微生物増殖用の培地に加えることを特徴とする人工培養用の培地を用いた線虫の天敵微生物の増殖方法。

【請求項2】 線虫の天敵微生物がバクトリア属細菌である請求項1に記載の線虫の天敵微生物の増殖方法。

【請求項3】 (A)の代替として、線虫の抽出物に含まれる栄養分および/または、化学成分を用いる請求項1に記載の線虫の天敵微生物の増殖方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は作物に被害をもたらす植物寄生性線虫の防除手段として有用な、線虫の天敵微生物の生産に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】土壌中に棲息する線虫を防除するために、従来は薰蒸剤などの化学的防除剤が使用されてきた。しかし環境汚染への懸念から、化学薬剤を用いず線虫の天敵微生物を用いて線虫害を防除する方法が求められている。

【0003】線虫の天敵微生物の中で絶対寄生菌に分類されているバクトリア属細菌は、寄主線虫のみを宿主として増殖するために、土壌の生物環境を攪乱しない好適な微生物として実用化が望まれている。

【0004】本微生物の増殖方法としては、植物の土壌に微生物を寄生させた線虫を接種して、植物の根で増殖した微生物を回収する方法がおこなわれている。しかしこの方法による微生物の増殖効率は、農業への適用には不十分な水準である。

【0005】このため微生物培養の手段によってこの微生物を直接的に培養しようとする試みが過去におこなわれたが、現在まで成功に至っていない。

【0006】ウィリアムズらは、人工培地を用いた本微生物の培養について検討し、人工培養に成功しなかったと報告している(Journal of Applied Bacteriology (1989) 67,145-156)。

【0007】ビショップらは、特定の微生物(サーモアクチノマイセス・バルガリス)の破碎液を添加した培地で本微生物の増殖が認められたと報告しているが(Biocontrol Science & Technology (1991) 1,101-104)、増殖後に本微生物の溶菌が起こり胞子は得られなかったと報告している。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、難培養性であるために絶対寄生菌とみなされているバクトリア属細菌を人工培養するために、好適な培地を提供することにある。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者はバクトリア属細菌の人工培養に使用する培地の組成について鋭意検討

した結果線虫の抽出物を微生物の培養培地に添加することにより、バクトリア属細菌が良好に増殖して多数の胞子を形成することを発見し、本発明を完成した。

【0010】本発明は(A)線虫の抽出物を(B)微生物の培養培地に添加することにより得られる、バクトリア属細菌の人工培養用の培地を用いた線虫の天敵微生物の増殖方法である。

【0011】本発明で使用される線虫の抽出物は自活性線虫、食菌性線虫、植物寄生性線虫より調整できる。例えば、メロイドギネ、ヘテロデラ、プラチレンカス等の天然の寄主、ターバトリックス、セノラデティス等の人工培養が容易な線虫類の抽出物が用いられる。

【0012】本発明では、一般の培地に不足している栄養素の供給のための実際的な方法として線虫の抽出物を添加している。従って、線虫の抽出物に含まれる糖質、蛋白質、糖蛋白、アミノ酸や脂肪酸、グリセリド、糖脂質、ステロイド等の化学成分の添加によって同様の効果を得ることができる。

【0013】本発明で使用される微生物の培養培地は、既知の培地組成を参考にして調整できる。例えば、マイコプラズマ、スピロプラズマ等の培養に適した人工培養培地が用いられる。

【0014】これらの培地成分を混合し、糖などの栄養素量や培地の浸透圧を調整して人工培養培地を調整する。好適な浸透圧とは天然の寄生環境と同一な条件である。

【0015】このようにして得られる本発明の培地は、線虫の体内に存在する天敵微生物の発育に必要な栄養素を含有し、天敵微生物の人工培養用培地として好適である。

## 【0016】

【実施例】以下本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

## 【0017】線虫の破碎液の調製

線虫の破碎液として、セノラデティス・エレガンスの破碎液を以下のような方法により作製した。

【0018】大豆ペプトン(ディフコ社)30g、酵母抽出液(ディフコ社)30g、ブドウ糖(和光純薬社)10g、MES(和光純薬社)4.3gを蒸留水950mlに溶解し、酢酸でpH5.2に調製した後オートクレーブ滅菌をおこなった。豚由来ヘモグロビン(東京化成社)1.0gを20mlの蒸留水に溶解し、滅菌ろ過をおこなってオートクレーブ後の培地に添加して線虫培養用の培地を調製した。

【0019】この培地に8万匹の線虫を添加して20℃で16日間エアレーションした。2千万匹に増殖した線虫を3500回転の遠心分離で沈下させて集め、蒸留水に懸濁して線虫を洗った。再度遠心して13gの新鮮な線虫を得た。

【0020】この線虫を凍結融解し、蒸留水10mlを

加えて1分間細胞破砕機(ブランソン社、ソニファイアー)にかけた。破砕液をさらにホモジナイザー(井内盛栄堂社)で1500回転で5分間ホモジナイズした。ホモジナイズ液を16000回転で20分間遠心して沈下物を除き、滅菌ろ過をおこなって16.8mlの線虫破砕液を調製した。

#### 【0021】人工培養培地の作製

基礎培地として、スピロプラズマ培養用のSP-4培地をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション・メディアム・ハンドブック(ATCC Medium handbook, pp49, 1st Ed., 1984)に従い調製した。SP-4培地は、PPL Oプロス(ディフコ社)3.5g、トリプトン(ディフコ社)10.0g、ペプトン(ディフコ社)5.3g、グルコース(和光純薬社)5.0gを蒸留水615mlに溶かしてpHを6.2に合わせた後、オートクレーブ滅菌を行い、その後CMRL1066培地(ギブコ社)50ml、イースト抽出液(ギブコ社)35ml、イーストレート(ディフコ社)100ml、ウシ胎児血清(シグマ社)170ml、フェノールレッド(シグマ社)20mlを添加して調製した。

【0022】SP-4培地75mlと線虫破砕液25mlを混合し、苛性ソーダでpHを6.2に合わせ、滅菌ろ過をおこなって人工培養培地を作製した。

#### 【0023】実施例1

表2

雌成虫1匹当たりのバストリア属細菌の発生期の形態の数

増殖期	初期	後期	四葉期	二葉期	孢子形成期
培養開始時	2610	1460	740	160	50
10日後	1480	200	100	30	4490

#### 【0028】比較例1

線虫混合液を添加せずに調製した人工培養培地を用いて実施例1と同様の実験をおこなった。培養開始時と7日後のバストリア・ペネトランスの各相の観察数を表3に示した。

#### 【0029】表3

雌成虫1匹当たりのバストリア属細菌の発生期の形態の数

増殖期	初期	後期	四葉期	※
-----	----	----	-----	---

\* 培養器に人工培養培地500μlを入れ、67匹のメロイドギネ・インコグニータの雌成虫より取得した増殖期のバストリア・ペネトランスを加え、炭酸ガスインキュベーター中で28℃に保った。培養開始8日後に遠心分離機を用いてバストリア・ペネトランスを回収し、増殖相の増加について観察した。

【0024】培養開始時と8日後のバストリア・ペネトランスの各相の観察数を表1に示した。

#### 【0025】表1

10 雌成虫1匹当たりのバストリア属細菌の発生期の形態の数

増殖期	初期	後期	四葉期
培養開始時	3400	0	0
8日後	14500	3700	4800

#### 【0026】実施例2

実施例1と同様の人工培養培地800μlを培養器に入れ、70匹のメロイドギネ・インコグニータの雌成虫より取得した増殖期のバストリア・ペネトランスを加え、炭酸ガスインキュベーター中で28℃に保った。培養開始10日後に遠心分離機を用いてバストリア属細菌を回収し、孢子形成について観察した。この実験における培養開始時と10日後のバストリア・ペネトランスの各相の観察数を表2に示した。

#### \* 【0027】

30※培養開始時	4640	0	14
7日後	3220	14	0

#### 【0030】

【発明の効果】線虫の抽出物を加えることを特徴とする本発明で用いる人工培養培地は、従来の微生物培養用の培地に不足している栄養成分を付与することにより、線虫の天敵微生物、とくにバストリア属細菌の増殖用の培地として好適である。